

令和元年6月17日現在

機関番号：82708

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K14784

研究課題名(和文)ピコ真核藻類の隠れた生活史戦略：TSA-FISH法を用いた細胞の可視化による解明

研究課題名(英文)Expoloring life cycle of picoeukaryotic algae using TSA-FISH method

研究代表者

桑田 晃(Kuwata, Akira)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・東北水産研究所・グループ長

研究者番号：40371794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：サイズが2-3 $\mu$ mと微小なピコ真核藻類のグループ毎の生態解明には、個々の細胞をグループ毎に識別する方法が不可欠である。ピコ真核藻類のグループの一つパルマ藻を対象に、TSA-FISH法による細胞の識別法の確立を行った。またパルマ藻は、シリカの殻を持つステージと無殻で鞭毛のステージがあることが明らかとなっており、これらの生活史の識別のため、シリカを選択的に染色する蛍光色素を用いて、シリカの殻の有無を判別する方法を確立した。実際の現場でサンプリングを行い、これらの方法の検証を行った。さらに、走査電子顕微鏡観察により、ピコサイズの珪藻類Minidiscusの生活史を発見・解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年ピコ真核藻類の海洋の物質循環における重要性および多様性の高さが明らかとなってきたが、グループ・個体群レベルの生態、生活史等の情報は未だにほとんど不明である。本研究のTSA-FISH法を用いたピコ真核藻類の細胞レベルでの識別法によりピコ真核藻類のグループ・個体群レベルでの生態研究が可能となった。また、ピコ真核藻類の生活史の実態をパルマ藻とピコサイズの珪藻で初めて捉えることができた。

研究成果の概要(英文)：To understand ecology of each picoeukaryotic algal group, identifying individual picoeukaryotic algal cells at class, order or genus level is necessary. In this study, we focused on Parmales, a group of silicified picoeukaryotic algae, and established a TSA-FISH method for visualizing individual cells of this algal group under an epifluorescence microscope. This algal group have been revealed to have two different life cycle stages, silicified cells and naked flagellated cells. To distinguish these life cycle stages, a labelling method of the silicified cells using a fluorescent dye was also developed. We applied these methods for natural seasonal samples. Additionally, we revealed specific life cycle of a pico-sized centric diatom, Minidiscus by SEM observation of natural samples.

研究分野：植物プランクトンの生理生態学

キーワード：プランクトン ピコ真核藻類 生活史 パルマ藻 珪藻 海洋生態学

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

かつて、ピコ真核藻類に関する研究は、中～大型プランクトンを対象とした研究に比べ大きく立ち後れていた。細胞サイズが極めて小さい上 ( $\phi$  約  $2\text{--}3\ \mu\text{m}$ )、形態も単純なため、光学顕微鏡下での種同定が不可能であり、現場での挙動を把握できなかったことがその一因である。近年、分子生物学的手法の進歩により海洋生物学的分野におけるピコ真核藻類に関する研究が大きく加速し、現在、海洋環境中におけるピコ真核藻類の物質循環における重要性および潜在的な多様性の高さが広く認識されるに至った。しかしながら、ピコ真核藻類に関する理解はまだまだ限定的であり、特に個々の実際の現場での生態については、ほとんど明らかにされていないのが現状である。また、ピコ真核藻類は、極微小な細胞サイズながら単なる細胞分裂による増殖だけではなく、より複雑な生活史を持ち生存している可能性がゲノム解析により示唆されている。しかし、未だに生活史が発見された例はなく、その実体は全く不明であった。

ピコ真核藻類の 1 グループであるパルマ藻は主に極域・亜寒帯域に分布し、珪酸質の殻を持つことから、海洋で最も繁栄している珪藻との近縁性が注目されてきた。だが、パルマ藻の発見以来、30 年以上にわたり培養が成功しなかったためその実体は不明であった。近年は、親潮域より世界で初めてパルマ藻 (*T. laevis*) の単離・培養することに成功した。分子系統解析の結果、培養株は、珪藻の姉妹群であるピコ真核藻類ポリド藻と同じクレードに入るほど近縁であること (すなわちパルマ藻が珪藻と共通祖先を持つこと) を明らかにした。さらに、パルマ藻が珪酸質の殻を持つ「有殻細胞」のステージと、極近縁のポリド藻に類似した無殻で遊泳性の「鞭毛細胞」のステージを持つことを発見した。これは、ピコ真核藻類の生活史の存在と実態が明らかとなった初めての事例と考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究は、パルマ藻を対象にピコ真核藻類の現場における動態、および生活史の解明を目指し、TSA-FISH (Tyramide signal amplification- fluorescence in situ hybridization) 法の改良により自然群集からパルマ藻の細胞を蛍光顕微鏡下で識別・計数する方法、さらに、この藻類が示す「有殻細胞」と「鞭毛細胞」の両細胞ステージを蛍光顕微鏡下で識別する方法を開発する。次に、この方法を用いて、生育域である親潮域をフィールドとして現場サンプルを取得し、開発した 2 つの方法を現場サンプルに適用し、ピコ真核藻類:パルマ藻の現場における生活史を含めた動態の解明にのぞむ。

### 3. 研究の方法

#### 1) TSA-FISH 法の改良による蛍光顕微鏡下でのパルマ藻の細胞の計数法の開発

パルマ藻を対象とした TSA-FISH 法の開発のため、パルマ藻に適したプローブを検討し、最適な染色条件を培養株を用いて決定した。パルマ藻は特に *Triparma* 属を対象とした。

#### 2) パルマ藻の生活史を識別する観察法の開発

珪酸質を特異的に染色する蛍光色素を用いて、珪酸質の殻を持つ有核細胞の検出法を培養株を用いて検討した。

#### 3) 現場におけるパルマ藻の生活史を含めた季節動態の観測

パルマ藻の主要な生育海域の一つである親潮域の定線観測ライン A-line 上の定点において海洋観測とともに春季 5 月、夏季 7 月、秋季 10 月に採取し保存していた植物プランクトン試料を用いて、上記の観察法によりサンプルの分析を行い、パルマ藻の動態を解析した。

#### 4) 走査顕微鏡 (SEM) 観察による、ピコ真核藻類:微小珪藻の生活史の解析

パルマ藻と同様にピコ真核藻類で珪酸質の殻を持つ微小珪藻の生活史を SEM 観察により解析した。

### 4. 研究成果

#### 1) TSA-FISH 法の改良による蛍光顕微鏡下でのパルマ藻の細胞の計数法の開発

まず、パルマ藻の TSA-FISH 法のため、パルマ藻に特異的なプローブを新規に 2 つ設計した。しかしながら、設計した新規のプローブは、どちらも反応が見られなかった。さらに補助的なプローブを加える改良法も試みたが、反応が見られなかった。そこで、パルマ藻に特異的なプローブの設計は中断し、既存のプローブを検討した。その結果、パルマ藻と同じポリド藻綱で同じ属のポリド藻に特異的なプローブを用いたところ、パルマ藻でも適用可能なことが判明し、当プローブを使用することとした。次に、TSA-FISH 法の最適な染色条件を様々な条件で検討し、決定し、パルマ藻の TSA-FISH 法を確立した(図1)。

#### 2) パルマ藻の生活史を識別する観察法の開発

まず、珪酸質を特異的に染色する蛍光色素 PDMPO 添加して 1 日培養した試料を TSA-FISH 法で観察することにより、珪酸質の殻を持つパルマ藻の有殻細胞を検出する方法を検討した。しかしながら、TSA-FISH 法観察のための固定処理等を行った試料では、PDMPO のシグナルは得られなかった。

次に、ホルマリン固定した試料でも適用可能な珪酸質を特異的に染色する蛍光色素、FITC-silane の使用を検討した。その結果、固定した試料でもパルマ藻の珪酸質の殻が蛍光染色され、有殻細胞の検

出が可能となった。よって、パルマ藻の生活史ステージ判別する方法として、FITC-silane により珪酸質の殻を持つ有核細胞を検出する方法を選定した。

### 3) 現場におけるパルマ藻の生活史を含めた季節動態の観測

親潮域の定点において春季から秋季にかけて、採取した試料を対象に、TSA-FISH 法によりパルマ藻を計数した。その結果、春季から夏季に向けて表層、亜表層において細胞の増加が見られ、夏季から秋季にかけても表層にパルマ藻の細胞が検出された。次に FITC-silane 染色法により有核細胞を観察すると、夏季-秋季の表層では有核細胞が検出されなかった。これまでに SEM 観察によりシリカの殻を持つ有殻のパルマ藻は冬季-春季の低水温期に主に増殖し、夏季-秋季の表層水温の高水温期には表層から消失することが明らかとなっている。よって本結果により、夏季と秋季の高水温の表層にパルマ藻の鞭毛細胞が出現している可能性が示唆された。今後は TSA-FISH 法と FITC-silane 染色法の二重染色法の開発によるより直接的な観察法の開発と更に多くの現場試料の検証を進める予定である。また、鞭毛細胞の形成過程については、様々な条件下での培養実験により検証を進める予定である。

### 4) ピコ真核藻類: 微小珪藻の生活史の解析

ピコ真核藻類で珪酸質の殻を持つ微小珪藻の 1 種 *Minidiscus comicus* が地中海の試料より多数見られ、また様々なサイズ形態の細胞が観察された。SEM 観察により詳細に解析を行った結果、*M. comicus* は、サイズが数  $\mu\text{m}$  と微小ながら通常の珪藻と同様、増大胞子を形成していることが明らかとなった (図 2)。

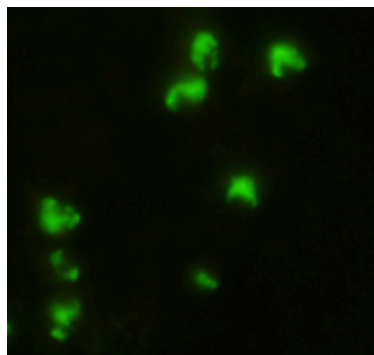


図 1 TSA-FISH 法によるパルマ藻細胞の検出

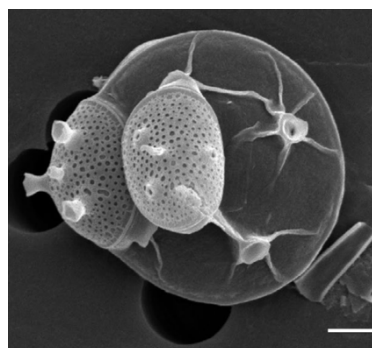


図 2 *Minidiscus comicus* の増大胞子  
スケール:  $1 \mu\text{m}$  (Jewson et al. 2016 より)

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Ichinomiya M., Lopes A., Gourvil .P, Yoshikawa S., Kamiya M., Ohki K., Audic S., Vargas C., Noel M., Vaultot D., Kuwata A., Diversity and oceanic distribution of the Parmales (Bolidophyceae), a picoplanktonic group closely related to diatoms, ISME Journal、査読有、Vol.10、2016、2419-2434
- ② Jewson D, Kuwata A, Cros L, Fortuno JM, Estrada M、Morphological adaptations to small size in the marine diatom *Minidiscus comicus*, Scientia Marina、査読有、Vol.80、2016、89-96
- ③ Jordi Sole, Elisa Berdalet, Laura Arin, Lluisa Cros, Maximinimo Delgado, Akira Kuwata, Clara Llebot, Celia Marrase, The ecology of plankton in biological oceanography: a tribute to Marta Estrada' s task, Scientia Marina、査読有、Vol. 80、2016、33-38
- ④ 一宮陸雄, 桑田 晃、培養株確立によって明らかとなってきた未知の藻類: パルマ藻、藻類: Jpn. J. Phycol.、査読有、65 巻、2017、153-158
- ⑤ Kuwata Akira, Yamada Kazumasa, Ichinomiya Mutsuo, Yoshikawa Shinya, Tragin Margot, Vaultot Daniel, Lopes dos Santos Adriana, Bolidophyceae, a Sister Picoplanktonic Group of Diatoms - A Review, Frontiers in Marine Science、査読有、Vol. 5、No. 370、2018、1-17
- ⑥ Yamada Kazumasa, Katsura Hirotaka, Noel Mary-Helene, Ichinomiya Mutsuo, Kuwata Akira, Sato Shinya, Yoshikawa Shinya, Ontogenetic analysis of siliceous cell wall formation in *Triparma laevis* f. *inornata* (Parmales, Stramenopiles), Journal of Phycology、査読有、Vol. 55、2018、196-203
- ⑦ Ichinomiya Mutsuo, Yamada Kazumasa, Nakagawa Yoshizumi, Nishino Yasuto, Kasai Hiromi, Kuwata Akira, Parmales abundance and species composition in the waters

[学会発表] (計 9 件)

- ① Kuwata A、Exploring the evolutionary link between Parmales and the success of diatoms in marine ecosystems、Gordon Research Conference “Marine Molecular Ecology”、2015
- ② 桑田晃、佐藤晋也、パルマ藻から珪藻の進化の秘密を探る、日本進化学会第 17 回大会、2015
- ③ 桑田 晃、一宮睦雄、吉川伸哉、Adriana Lopes、Daniel Vaultot、珪藻の姉妹群パルマ藻とボリド藻の多様性と全球分布、日本海洋学会 2015 年度秋季大会、2015
- ④ Kuwata A. Biology of a picoeukaryotic phytoplankton, Parmales, a sister group of diatoms、EMBO | EMBL Symposium: A New Age of Discovery for Aquatic Microeukaryotes、2016
- ⑤ 森 留菜、庄野 孝範、浜本 洋子、桑田 晃、本多 大輔、ラビリントウ類に対する CARD-FISH 法による検出法の検討、日本藻類学会第 41 回大会、2017
- ⑥ 桑田 晃、一宮睦雄、吉川伸哉、山田和正、河地正伸、Mary-Helene Noel、斉藤 憲治、中村 洋路、沢田健、Adriana Lopes dos Santos、Daniel Vaultot、Biology of a picoeukaryotic phytoplankton, Parmales (Bolidophyceae), a sister group of diatoms、The IVth International Conference “Molecular Life of Diatoms”、2017
- ⑦ 桑田 晃、一宮睦雄、吉川伸哉、Daniel Vaultot、Adriana Lopes dos Santos、珪藻の進化・繁栄の謎を握る未知の藻類：パルマ藻の多様性と全球分布、日本植物学会第 81 回大会、2017
- ⑧ 佐藤晋也、吉川伸哉、南雲保、出井雅彦、桑田 晃、一宮睦雄、Morphology, phylogeny and whole genome sequence of a hitherto undescribed scaly Parmales, a reminiscent of pre-diatom?、25th International Diatom Symposium、2018
- ⑨ 山田和正、斉藤柚香、一宮睦雄、谷内 由貴子、黒田 寛、葛西 広海、田中 雄大、長谷川 大介、岡崎 雄二、寛 茂穂、桑田 晃、親潮域における真核ピコ藻類パルマ藻群集の種組成と増殖速度の季節変動、2018 年度日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会、2018

[図書] (計 1 件)

- ① Kuwata A., Jewson D., Springer、Ecology and evolution of marine diatoms and Parmales. In Marine Protists: Diversity and Dynamics、251-175

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：山田和正、一宮睦雄、田中厚子

ローマ字氏名： Kazumasa Yamada, Mutsuo Ichinomiya, Atsuko Tanaka, Ramon Massana, Irene Forn, David Jewson, Lluisa Cros, Jose Manuel José Manuel Fortuño, Marta Estrada, Maximinimo Delgado

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。